

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ANDRESSA ALVES CLEMENTE

FENOTIPAGEM POR IMAGEM EM GENÓTIPOS DE ALFACE CRESPA ROXA COM
DIVERSIDADE GENÉTICA PARA NÍVEIS DE CAROTENOIDES

Monte Carmelo
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
ANDRESSA ALVES CLEMENTE

FENOTIPAGEM POR IMAGEM EM GENÓTIPOS DE ALFACE CRESPA ROXA COM
DIVERSIDADE GENÉTICA PARA NÍVEIS DE CAROTENOIDES

Trabalho de Conclusão apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, como requisito necessário para a obtenção do grau de Engenheira Agrônoma.

Orientador (a): Prof. Dr. Gabriel Mascarenhas Maciel

Monte Carmelo
2019

ANDRESSA ALVES CLEMENTE

FENOTIPAGEM POR IMAGEM EM GENÓTIPOS DE ALFACE CRESPA ROXA COM
DIVERSIDADE GENÉTICA PARA NÍVEIS DE CAROTENOIDES

Trabalho de Conclusão apresentado ao curso
de Agronomia da Universidade Federal de
Uberlândia, Campus Monte Carmelo, como
requisito necessário para a obtenção do grau
de Engenheira Agrônoma.

Monte Carmelo, 13 de junho de 2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gabriel Mascarenhas Maciel
Orientador (a)

Profa. Dra. Ana Carolina Silva Siquieroli
Membro da Banca

Sc.M. Joicy Vitória Miranda Peixoto
Membro da Banca

Monte Carmelo
2019

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, meu amor, companheiro e abrigo, ao meu pai Petronio, minha mãe Maria José, meus irmãos e aos que enfrentam diariamente os desafios da produção vegetal.

“Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver caridade, não sou nada. ” 1Coríntios 13,2

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Trindade Santa (Deus Pai, Jesus e o Espírito Santo) e a Maria Santíssima pela proteção, discernimento, inteligência e graças recebidas.

Agradeço aos meus amados pais, Petronio Davi Alves e Maria José Clemente Alves, pelo apoio, incentivo, companheirismo, carinho e principalmente pelos ensinamentos, dentre eles o amor pela agricultura.

Aos meus irmãos, Alessandra Alves Clemente e Clayton Alves Clemente, pelo carinho, cumplicidade e apoio, por serem sempre solícitos às minhas necessidades, e também ao meu cunhado Jaci Filho.

À minha amada avó Terezinha e meu tio João Paulo, pelo acolhimento e atenção, que foram essenciais nessa caminhada.

Aos discentes do curso de Agronomia da UFU Campus Monte Carmelo, pelos ensinamentos, minha eterna gratidão. Agradeço em especial ao meu orientador, Dr. Gabriel M. Maciel e a querida professora Dra. Ana Carolina S. Siquieroli pelo exemplo e confiança em mim depositada.

Aos discentes do Instituto de Geografia, Rodrigo Gallis e Ricardo Barbosa, pela colaboração.

Aos membros do Grupo de Estudos em Melhoramento Genético de Hortaliças (GEN-HORT), cujo trabalho em equipe possibilitou a realização deste trabalho e em especial ao senhor José Marques Vilela, por auxiliar na condução dos experimentos e ser sempre muito prestativo.

Aos meus amigos, pelo apoio, em especial Breno, Larissa, Andreza, Hellen, Daniel, Letícia, Charlys, Eurípedes Junior, Lucas Brenno e Mariana, que sempre tornam meus dias mais leves e felizes.

Ao Grupo de Oração Universitário Providência Divina (GOU), pelo suporte e por nos ajudar aliar a fé e o conhecimento científico.

À Cnpq, Capes, Fapemig e UFU pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pela avaliação do trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 OBJETIVOS	4
3 REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1 CULTURA DA ALFACE E CAROTENOIDES	4
3.2 CARACTERIZAÇÃO DE BANCO DE GERMOPLASMA	6
3.3 FENOTIPAGEM POR IMAGEM	7
4 MATERIAL E MÉTODOS	8
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
5.1 AVALIAÇÃO AGRONÔMICA DO GERMOPLASMA	10
5.2 CONFIRMAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DENTRO DO BANCO DE GERMOPLASMA	14
5.3 VALIDAÇÃO DA FENOTIPAGEM POR IMAGENS PARA A IDENTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA USANDO ÍNDICE SPAD/CAROTENOIDE	18
6 CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

RESUMO

O desenvolvimento de alimentos biofortificados é um objetivo dos programas de melhoramento genético. No entanto, os custos de análise e o tempo necessário para a amostragem de folhas no campo são obstáculos a este processo. Os objetivos deste estudo foram avaliar a diversidade do germoplasma de alface crespa roxa e avaliar o uso da fenotipagem por imagem para identificação de genótipos ricos em carotenoides. O experimento foi realizado em 2018 na Estação Experimental de Hortaliças da Universidade Federal de Uberlândia - Campus Monte Carmelo. Trinta linhagens de alface roxa foram avaliadas. Todas as linhagens resultaram da hibridação das cultivares Belíssima e Uberlândia 10000 e seis sucessivas autofecundações, realizadas de 2013 a 2017. O método genealógico ou pedigree é um procedimento de seleção usado por melhoristas de plantas que trabalham com espécies que possuem sistema reprodutivo autógamo e apresentam cleistogamia. Este método foi usado para obter os tratamentos do experimento. A cultivar Belíssima (alface crespa roxa) foi utilizada como testemunha, totalizando 31 tratamentos. O método tradicional e fenotipagem por imagem aérea usando aeronave remotamente pilotada Phantom 4 (ARP) foram usados para avaliar seis diferentes características agronômicas e níveis de carotenoides de cada tratamento. Os resultados mostraram diversidade genética dentro do banco de germoplasma. Além disso, a fenotipagem por imagem de alto desempenho foi altamente correlacionada com a metodologia tradicional ($r = -0,8732$, coeficiente de determinação = 76,25%) e pode, portanto, ser considerada uma alternativa para identificar diferentes origens genéticas dentro de um banco de germoplasma. ARPs também podem ser usadas para monitorar os níveis de biofortificação em cultivos.

Palavras-Chave: Geotecnologia, biofortificação, banco de germoplasma, diversidade genética, aeronave remotamente pilotada (ARP).

ABSTRACT

Developing biofortified foods is a goal of genetic breeding programs. However, analysis costs and the time required for leaf sampling in the field are hindrances to this process. The objectives of this study were to evaluate the genetic diversity in red leaf lettuce germplasm and to evaluate the use of image phenotyping for the identification of carotenoid-rich genotypes. The experiment was carried out in 2018 at the Vegetable Experiment Station of the Federal University of Uberlândia-Monte Carmelo campus. Thirty inbred lines of red leaf lettuce were evaluated. All inbred lines resulted from the hybridization of the Belíssima and Uberlândia 10000 cultivars and six successive selfings, carried out from 2013 to 2017. The genealogical method or pedigree is a working procedure used by plant breeders working with plant species whose reproductive system is autogamous and presenting cleistogamy. This method was used to obtain the treatments of the experiment. The cultivar Belíssima (red lettuce) was used as a control, totaling 31 treatments. A conventional method and an aerial image phenotyping using Phantom 4 unmanned aerial vehicle (UAV) were used to evaluate six different agronomic characteristics and carotenoid levels of each treatment. The results showed substantial genetic diversity within the germplasm bank. Furthermore, high performance image phenotyping was highly correlated with the traditional methodology ($r = -0.8732$, coefficient of determination = 76.25%) and can therefore be considered an alternative for identifying different genetic backgrounds within a germplasm bank. Unmanned aerial vehicle (UAV) might also be used to monitor biofortification levels in crops.

Keywords: Geotechnology, biofortification, germplasm bank, genetic diversity, unmanned aerial vehicle (UAV).

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) possui vários tipos, formas e cores resultando nos diferentes tipos de segmentos (crespa, lisa, romana e americana) (Sala e Costa, 2012). A diversidade genética existente possibilita aos produtores várias opções de cultivo. No Brasil, a preferência é pelas cultivares do tipo crespa em relação aos tipos americana, lisa e romana (Sala *et al.*, 2008; Sala e Costa, 2012). Dentro do segmento de alface crespa, 2380 hectares são ocupados por cultivares crespas de cor roxa (ABCSEM, 2016).

O cultivo de alface crespa roxa tem proporcionado aos produtores alcançar nichos de mercado específico conseguindo agregar maior valor ao produto. Além do aspecto visual atrativo, o consumo de alface pode auxiliar preventivamente diversas doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Maiani *et al.*, 2009; Rocha e Reed, 2014) devido a presença de carotenoides precursores da vitamina A (Souza *et al.*, 2008; Silva e Mura, 2010; Cassetari *et al.*, 2015;). Apesar de todos quesitos qualitativos e comerciais, atualmente não há disponível cultivares de alface crespa roxa ricas em carotenoides. Silva *et al.* (2007) identificaram uma cultivar do tipo lisa com folhas de coloração verde rica em carotenoides (Uberlândia 10000). Poucas pesquisas têm buscado obter cultivares de alface ricas em carotenoides. Um provável motivo pode estar relacionado com o alto custo para analisar o constituinte nas folhas além da grande demanda de tempo para realizar as análises laboratoriais.

Há pesquisas que demonstraram metodologias mais econômicas e eficientes contribuindo para o sucesso dos programas de melhoramento com esta finalidade. Cassetari *et al.* (2015) sugerem quantificar indiretamente carotenoides a partir do teor de clorofila nas folhas a partir do uso do índice SPAD. No entanto, estão disponíveis novas modalidades para coleta de resultados capazes de revolucionar a fenotipagem de plantas com diferentes níveis de carotenoide. A fenotipagem por imagem é amplamente utilizada para outros vegetais auxiliando na seleção de plantas (Brisson *et al.*, 2010; Souza, 2014; Souza *et al.*, 2015), exceto em alface.

A partir do uso da fenotipagem por imagem torna-se possível determinar valores qualitativos e/ou quantitativos das características em estudo e correlacioná-las ao desempenho de um genótipo em determinado ambiente (Dhondt *et al.*, 2013). A fenotipagem de plantas tem sido associada a análises ópticas não destrutivas de características vegetais,

principalmente com o uso de imagens (Walter *et al.*, 2015). As técnicas utilizadas atualmente em fenômica de plantas atua de forma multidisciplinar incluindo a espectroscopia, com a geração de imagens (Souza *et al.*, 2015). As imagens podem ser facilmente coletadas com auxílio das aeronaves remotamente pilotadas (ARPs), também denominadas “Drones”. Essas aeronaves podem embarcar diversos tipos de câmaras com sensores que capturam desde o espectro eletromagnético visível até o espectro do infravermelho, possibilitando diversas análises das características vegetais (Souza *et al.*, 2015). Essa combinação entre a alta resolução espacial e temporal é um dos principais atrativos para o emprego dessa tecnologia na fenotipagem de alfaces. Pesquisas atuais buscam correlacionar a reflectância da vegetação com características das plantas em diversas espécies vegetais (Antunes *et al.*, 2012; Johann *et al.*, 2012; Luiz *et al.*, 2012; Risso *et al.*, 2012; Santi *et al.*, 2012; Victoria *et al.*, 2012; Vicente *et al.*, 2012; Grego *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012), exceto para hortaliças.

O uso de técnicas de fenotipagem por imagem para auxiliar a seleção indireta de genótipos de alface ricas em carotenoides ainda não é uma realidade, sendo uma alternativa no melhoramento que possibilita conhecer a qualidade nutricional do alimento direcionado a mesa do consumidor.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos comprovar a diversidade genética no germoplasma de alface crespa roxa e validar o uso da fenotipagem por imagem na identificação de genótipos ricos em carotenoides.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CULTURA DA ALFACE E CAROTENOIDES

Originária da região do mediterrâneo, a alface (*Lactuca sativa* L.), pertencente à família Asteraceae, é a hortaliça folhosa mais consumida no mundo e a de maior importância econômica e social no Brasil (Sala e Costa, 2012). A espécie é bianual, autogâmica com cleistogamia, com ciclo curto para o consumo (Ryder, 1999; Costa e Sala, 2005).

Devido a elevada produtividade e por apresentar ciclo de cultivo curto, a cultura da alface pode trazer elevado retorno financeiro, sendo considerada muito adequada também para pequenos produtores rurais. Além da importância econômica, a alface tem grande importância social e à dieta, pois chega à mesa do consumidor com preço acessível, fornecendo vitaminas, sais minerais e fibras a baixo custo (Barbosa *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016).

As cultivares atuais apresentam baixos teores de carotenoides, um tipo de precursor da vitamina A, a qual em deficiência prolongada pode causar uma grave doença, a hipovitaminose A, que pode acarretar xerofthalmia e cegueira. Recentemente, foram reconhecidos inúmeros efeitos benéficos dos carotenoides, destacando-se a prevenção de cânceres, doenças do coração e degeneração macular, o que tem estimulado intensas pesquisas sobre o papel desses compostos como antioxidantes e como reguladores de resposta do sistema imune (Uenojo *et al.*, 2007).

Diante disso, os programas de melhoramento de alface visam desenvolver além de cultivares produtivas, bem adaptadas aos ambientes e resistentes ou tolerantes a doenças, cultivares biofortificadas para aumentar o conteúdo nutricional (Silva, 2017).

O teor de carotenoides em alface é controlado por um gene maior, que apresenta efeitos aditivos e de dominância, além de ser influenciada por poligenes de efeito menor. A característica apresenta alto valor de herdabilidade, indicando ser pouco influenciada pelo ambiente e assim há maior possibilidade de sucesso com a seleção de plantas com teores superiores a partir de populações segregantes (Cassetari, 2015). A cultivar Uberlândia 10000 é um exemplo de sucesso no ramo da biofortificação. Ela foi desenvolvida na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo o resultado de uma série de cruzamentos e seleção de genótipos superiores com maior teor de carotenoides (Sousa *et al.*, 2007).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DE BANCO DE GERMOPLASMA

Os bancos de germoplasma são importantes fontes para ampliação da base genética de espécies, evitando a diminuição ou perda da variabilidade genética de espécies cultivadas e seus parentes silvestres, bem como de variedades locais. Isso é possibilitado por possuírem genótipos coletados em diferentes épocas e regiões do mundo com características mais diversas quando comparados a um determinado genótipo considerado padrão comercial (Silva *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2010).

O germoplasma é a fonte de variabilidade genética disponível para o melhoramento de plantas. Entretanto para explorar a sua diversidade, é necessário que o banco de germoplasma esteja caracterizado. A caracterização é um importante elo entre a conservação e a utilização de recursos genéticos de plantas em programas de melhoramento, uma vez que o conhecimento sobre a diversidade genética existente direciona as tomadas de decisões do melhorista (Sharma *et al.*, 2018).

Segundo Amabile *et al.* (2018) a boa caracterização do banco de germoplasma associada ao compartilhamento das informações sobre os genótipos conservados aumenta a possibilidade de sua utilização em programas de melhoramento, ampliando assim as chances de os mesmos serem úteis no desenvolvimento de cultivares. Conhecendo a disponibilidade de populações com alta variabilidade genética para as características sob seleção, há maior chance de sucesso em um programa de melhoramento (Azevedo *et al.*, 2013).

Para facilitar a caracterização dos recursos genéticos de *L. sativa*, Křístková *et al.* (2008) elaboraram a descrição de caracteres morfológicos e biológicos de alface. São eles: a) descritores morfológicos: características de plântulas, folhas jovens, folhas externas (adultas), cabeça, haste, inflorescência e fruto; b) descritores biológicos: estágios de desenvolvimento e resistência a fatores bióticos e abióticos.

Além dos descritores morfológicos e biológicos, os descritores citogenéticos, químicos, bioquímicos e moleculares contribuem para a descrição de características dos genótipos pouco influenciadas pelo ambiente em sua expressão (Salomão, 2010; Barbieri, 2013).

3.3 FENOTIPAGEM POR IMAGEM

A fenotipagem consiste na determinação dos valores quantitativos ou qualitativos das características de um genótipo (Dhondt *et al.*, 2013). Determina também a relação das características estudadas (fenótipo) com o desempenho do genótipo em determinado ambiente (Dhondt *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2015).

As técnicas tradicionais de fenotipagem avaliam características integrativas, facilmente mensuráveis, como as relacionadas ao peso e ao tamanho dos órgãos e estruturas vegetais com protocolo simples (Sousa, 2014; Sousa *et al.*, 2015). Entretanto, para realizar o procedimento em uma população de plantas demandam grande volume de recursos financeiros, mão-de-obra e são demoradas.

Os melhoristas tem buscado diversas e complexas características na diversidade genética ou inseridas biotecnologicamente nas plantas. Essas novas características avaliadas se correlacionam com as características integrativas tradicionais, bem como são fundamentais para explicá-las (Sousa, 2014). Assim, surge a necessidade da complementação ou substituição dos métodos tradicionais por procedimentos mais precisos e dinâmicos.

Neste contexto, a fenotipagem dos indivíduos em estudo se configura como um dos principais desafios dos programas de melhoramento genético de plantas. Assim, são necessárias novas técnicas de fenotipagem de plantas que tragam avanços em escala, precisão, reprodutibilidade e exploração de novas características, em condições de campo (Durães *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2015, Guimarães, 2017).

Diante das limitações dos métodos tradicionais, o emprego de imagens para fenotipagem pode trazer muitos benefícios. As técnicas para captura das imagens geralmente são rápidas, não invasivas, precisas, de baixo custo, livres de resíduos, com boa resolução espacial e temporal, permitem explorar áreas relativamente grandes, proporcionam grande número de repetições e segurança ao operador (Sousa, 2014). A automação do processo de obtenção das imagens, dependendo da espécie vegetal, das condições de cultivo e das variáveis, viabiliza estudos comparativos e seleção fenotípica em larga-escala (Gebremedhin *et al.*, 2019). Por fim, a utilização dessas técnicas possibilita avaliar o impacto dos diferentes tipos de estresses sobre as plantas e parâmetros bioquímicos, sem a necessidade de destruí-las (Sousa, 2014).

Segundo Sousa (2014) há cinco tipos de sensores disponíveis para a captura de imagens em diferentes regiões do espectro eletromagnético: 1) sensores digitais para captura de imagens RGB; 2) sensores no visível para a captura de imagens de pigmentos; 3) sensores no infravermelho próximo para a captura de imagens relacionadas aos índices de água; 4) sensores no infravermelho longo para a captura de imagens térmicas; e 5) sensores para a captura de fluorescência, especialmente de clorofilas. Esses sensores permitem o estudo de diversas características como: análise do crescimento; determinação de pigmentos, como clorofilas e carotenoides; avaliação do aparato fotoquímico; temperatura da copa, para identificação de estresse hídrico e salino (Sousa, 2014). Apesar do potencial dessas ferramentas para fenotipagem em larga escala, em alface ainda não tem sido utilizadas.

Nas técnicas tradicionais, a precisão é fortemente prejudicada, especialmente ao operacional da coleta de dados, devido ao cansaço e imprecisão humana. Em vista disso, procura-se realizar a elaboração de métodos de fenotipagem por imagem voltados a ARPs (aeronaves remotamente pilotadas) a fim de se obter de forma automatizada os parâmetros antes coletados manualmente (Moraes *et al.*, 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em 2018 na Estação Experimental de Hortaliças da Universidade Federal de Uberlândia, campus Monte Carmelo (18°42'43,19"S; 47°29'55,8"; 873 m de altitude) e faz parte do Programa de Melhoramento Genético de alface Biofortificada e Tropicalizada da UFU.

Foram avaliadas 30 linhagens de alface tipo crespa com folhas roxas, provenientes da hibridação entre as cultivares Belíssima *versus* Uberlândia 10000, rica em carotenoide (Souza *et al.*, 2008) seguido de seis sucessivas autofecundações realizadas entre 2013 a 2017. O método de melhoramento utilizado foi o genealógico. Foi utilizada como testemunha a cultivar Belíssima (tipo crespa com folhas roxas) totalizando 31 tratamentos.

A semeadura foi realizada em 28 de março de 2018. As mudas foram produzidas em bandejas de poliestireno expandido com 200 células preenchidas com substrato comercial a base de fibra de coco. Após semeadura, as bandejas permaneceram em casa de vegetação

do tipo arco, com dimensões de 5 x 6 m e pé direito de 3,5 metros coberta com filme de polietileno transparente de 150 micra, aditivado contra raios ultravioleta, e cortinas laterais de tela branca anti-afídeos. Aos 29 dias após a semeadura as mudas foram transplantadas para canteiros definitivos em campo que foram formados utilizando rotoencanteirador de 1,30m de largura.

Antes de implantar o experimento foram coletadas amostras de solo na profundidade de 0 - 20 cm e analisadas no Laboratório de Fertilidade do Solo da Universidade Federal de Uberlândia. O resultado da análise físico-química está descrito a seguir: textura argilosa (> 50%); pH em $\text{CaCl}_2 = 4.9$; matéria orgânica = 3.9 dag kg^{-1} ; $\text{P(rem)} = 79.1 \text{ mg dm}^{-3}$; $\text{K} = 0.29 \text{ cmol-dm}^{-3}$; $\text{Ca} = 3.3 \text{ cmolc dm}^{-3}$; $\text{Mg} = 1.3 \text{ cmolcdm}^{-3}$; $\text{H} + \text{Al} = 4.9 \text{ cmolcdm}^{-3}$; $\text{SB} = 4.90 \text{ cmolcdm}^{-3}$; $\text{T} = 9.80 \text{ cmolcdm}^{-3}$; $\text{V}\% = 50$. Os tratos culturais foram realizados conforme preconizado para o cultivo de alface (Filgueira, 2013).

O experimento (Figura 1) foi constituído por 93 parcelas, com 16 plantas cada, separadas em quatro fileiras por canteiro no espaçamento de $0,25 \text{ m} \times 0,25 \text{ m}$, sendo avaliadas as oito plantas centrais. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados. A colheita foi realizada aos 35 dias após o transplantio e as plantas foram levadas para laboratório, onde se avaliou a massa fresca total obtida através da pesagem de todas as folhas externas. O diâmetro do caule foi avaliado com auxílio de um paquímetro. Foi determinado o número de folhas comerciais a partir da contagem de folhas superiores a 5 cm de comprimento. O diâmetro da planta foi avaliado e expresso em centímetros. A temperatura foliar foi obtida a partir do posicionamento de um termômetro infravermelho (modelo 4000.4GL, Everest Interscience, Tucson, AZ, USA) sendo amostrada as folhas superiores procurando-se apontar o sensor na posição central da superfície foliar. O índice SPAD/carotenoide (Cassetari *et al.*, 2015) foi obtido pelo valor médio após coletar os dados das quatro plantas centrais de cada parcela. Foi utilizado o equipamento clorofilômetro modelo Minolta SPAD-502 CFL1030. Também foi realizada a contagem dos dias para pendoamento após semeadura (DPS).

Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F ($p \leq 0,05$). As médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Em seguida, foram realizadas análises multivariadas de dissimilaridade genética entre os genótipos pela distância generalizada de Mahalanobis (D_{ii}^2). A divergência genética foi representada por

dendrograma obtido pelo método hierárquico *Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages* (UPGMA) e pelo método de otimização Tocher. A validação do agrupamento pelo método UPGMA foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenético (CCC) calculado pelo teste de Mantel (1967). A contribuição relativa dos caracteres quantitativos foi calculada segundo critério de Singh (1981). Todos os dados obtidos foram analisados utilizando-se o *software* Genes v. 2015.5.0 (Cruz, 2013).

Além de realizar a metodologia convencional proposta por Cassetari *et al.* (2015) a partir do índice SPAD/carotenoide, foi realizado a fenotipagem por imagem dos mesmos genótipos com a utilização de imagens aéreas coletadas por uma Aeronave Remotamente Pilotada (ARP), modelo Phantom 4 Advanced, com uma câmara de 20 megapixels. Os parâmetros utilizados no voo foram: altura de 20 metros, sobreposição longitudinal de 80% e sobreposição lateral de 75%. O voo foi realizado de modo automático com o software proprietário DroneDeploy. Com as imagens obtidas foi gerada uma ortoimagem com GSD (Ground Sample Distance) de 1 cm, com o programa Pix4d. O histograma no canal verde de cada imagem correspondente a uma linhaagem foi computado e para isso, foram selecionadas manualmente na ortoimagem. Foi realizada a correlação de Pearson entre o SPAD/carotenoide *versus* intensidade média do nível do canal G com o software SIGMA PLOT, com 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO AGRONÔMICA DO GERMOPLASMA

No período em que se desenvolveu o experimento, setembro a novembro as temperaturas máximas variaram de 19.5 a 36.5°C, com média máxima de 30°C, e as mínimas variaram de 11.8 a 22.7°C, com média mínima de 17.6°C, conforme dados obtidos pelo SISMET, 2018. Essas temperaturas foram desfavoráveis ao cultivo da alface, pois a variação ótima para a cultura é de 4 a 27°C (Santos *et al.*, 2009).

Houve diferenças significativas pelo teste F ($p \leq 0,05$) entre as linhagens para todas as variáveis respostas avaliadas, exceto para diâmetro de caule e temperatura foliar (Tabela 1).

Tabela 1. Médias referentes à massa fresca (MF), diâmetro de caule (DC), número de folhas (NF), diâmetro de planta (DP), temperatura foliar (TF), dias para pendoamento após semeadura (DPS) e índice SPAD/carotenoide (SPAD), em linhagens de alface do tipo crespa roxa.

Linhagens	MF (g)	DC (cm)	NF	DP (cm)	TF (°C)	DPS (dias)	SPAD	SR1 (%)
UFU-199#2#2#1	88,58 b	1,7 a	16,7 a	23,3 a	25,0 a	81,0 c	38,9 b	121,0
UFU-7#2#1#1	38,33 e	1,5 a	15,9 b	20,8 a	24,2 a	93,3 b	29,2 e	65,9
UFU-117#1#3#1	44,42 e	1,3 a	17,8 a	21,5 a	24,5 a	84,0 c	23,5 f	33,5
UFU-86#1#2#1	56,25 d	1,7 a	14,8 b	23,2 a	23,1 a	85,3 c	24,4 f	38,6
UFU-75#1#1#1	63,67 c	1,1 a	17,7 a	23,1 a	24,6 a	84,0 c	34,7 c	97,2
UFU-199#6#1#1	120,33 a	1,9 a	18,1 a	27,2 a	24,3 a	83,3 c	38,5 b	118,8
UFU-206#3#2#1	100,75 b	1,6 a	12,0 b	18,0 b	24,4 a	77,0 c	29,6 e	68,2
UFU-199#2#3#1	116,75 a	2,0 a	14,8 b	21,3 a	23,6 a	83,3 c	28,3 e	60,8
UFU-189#2#3#1	30,25 f	1,4 a	16,1 b	20,6 a	25,1 a	83,7 c	28,1 e	59,7
UFU-184#2#5#1	42,83 e	1,7 a	19,9 a	21,0 a	24,4 a	98,7 b	37,7 b	114,2
UFU-184#2#1#1	116,67 a	1,7 a	19,9 a	25,6 a	24,0 a	83,0 c	27,0 e	53,4
UFU-107#1#2#1	49,58 d	1,6 a	17,8 a	19,3 b	25,0 a	87,0 c	33,6 c	90,9
UFU-86#2#1#1	40,83 e	1,8 a	15,5 b	20,4 a	24,5 a	90,7 c	30,4 d	72,7
UFU-75#3#2#1	31,33 f	1,2 a	10,8 b	18,5 b	25,1 a	82,3 c	31,4 d	78,4
UFU-184#2#3#1	55,58 d	1,9 a	20,5 a	26,0 a	24,6 a	92,7 b	32,1 d	82,4
UFU-199#6#2#1	66,00 c	1,8 a	15,2 b	22,2 a	23,9 a	86,0 c	41,9 a	138,1
UFU-7#1#1#1	44,08 e	1,8 a	20,1 a	22,3 a	23,7 a	100,3 a	31,6 d	79,5
UFU-75#2#2#1	70,58 c	1,5 a	13,3 b	21,2 a	23,9 a	85,7 c	42,7 a	142,6
UFU-75#3#1#1	63,00 c	1,7 a	12,4 b	21,3 a	23,5 a	80,7 c	31,4 d	78,4
UFU-190#1#2#1	27,67 f	1,3 a	14,3 b	15,3 b	24,9 a	105,3 a	26,6 e	51,1
UFU-75#1#3#1	117,58	1,7 a	22,6 a	24,5 a	23,3 a	96,7 b	34,3 c	94,9
UFU-189#2#2#1	38,25 e	1,2 a	13,1 b	15,0 b	25,1 a	88,0 c	29,2 e	65,9
UFU-189#2#1#1	41,08 e	1,6 a	17,7 a	21,0 a	26,0 a	91,7 b	34,6 c	96,6
UFU-199#2#1#1	89,08 b	1,1 a	15,3 b	21,9 a	24,1 a	81,0 c	42,9 a	143,8
UFU-199#5#1#1	52,42 d	2,3 a	18,7 a	18,7 b	24,5 a	108,0 a	37,9 b	115,3
UFU-206#1#6#1	49,08 d	1,9 a	15,8 b	22,4 a	24,7 a	89,0 c	28,9 e	64,2
UFU-206#1#3#1	53,50 d	1,1 a	14,5 b	19,3 b	26,1 a	81,0 c	41,4 a	135,2
UFU-117#1#1#1	24,67 f	1,3 a	12,2 b	16,0 b	25,2 a	85,3 c	18,6 g	5,7
UFU-184#2#1	69,75 c	1,9 a	19,8 a	24,6 a	23,7 a	94,3 b	35,5 c	101,7

UFU-199#1#1#1	74,92 c	1,2 a	15,1 b	24,4 a	23,9 a	86,7 c	44,7 a	154,0
cv. Belíssima	23,25 f	1,3 a	8,3 b	10,9 b	24,1 a	86,7 c	17,6 g	0,0
Média geral	61,33	1,6	16,0	21,0	24,4	88,2	32,5	
CV(%)	14,42	40,29	16,78	17,13	6,37	4,87	5,58	

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 0,05 de significância.¹ (SR) Superioridade relativa das linhagens em relação à testemunha cv. Belíssima quanto à variável índice SPAD/carotenoide.

Fonte: Maciel *et al.*, 2019.

Em relação a massa fresca (MF), as linhagens UFU-199#6#1#1, UFU-75#1#3#1, UFU-199#2#3#1 e UFU-184#2#1#1 se destacaram diferenciando significativamente das demais linhagens, inclusive da testemunha comercial cv. Belíssima (Tabela 1). Os resultados das linhagens que se destacaram na presente pesquisa foram superiores aos encontrados por Blat *et al.* (2011) em relação a massa fresca de cultivares roxa (Pira Roxa e Belíssima) e similares a diversas pesquisas já realizadas (Diamante *et al.*, 2013; Suinaga *et al.*, 2013; Aquino *et al.*, 2014; Ziech *et al.*, 2014; Brzezinski *et al.*, 2017), indicativo que as linhagens do tipo crespa roxa apresentam padrão comercial.

As linhagens UFU-199#2#2#1, UFU-117#1#3#1, UFU-75#1#1#1, UFU-199#6#1#1, UFU-184#2#5#1, UFU-184#2#1#1, UFU-107#1#2#1, UFU-184#2#3#1, UFU-7#1#1#1, UFU-75#1#3#1, UFU-189#2#1#1, UFU-199#5#1#1 e UFU-184#2#1 se destacaram quanto ao número de folhas se diferenciando significativamente da testemunha comercial cv. Belíssima (Scott-knott, $p \leq 0,05$) (Tabela 1). Valores similares para número de folhas foi encontrado por diversos autores (Santos *et al.*, 2009; Diamante *et al.*, 2013; Blat *et al.*, 2011; Aquino *et al.*, 2014).

Até o momento, há poucas pesquisas sobre o desempenho agrônômico de cultivares de alface roxa. No entanto, pode-se observar que, em geral, que os indicadores agrônômicos das cultivares de alface verde superam os das cultivares roxas (Blat *et al.*, 2011). Todas as linhagens no presente estudo e especialmente o UFU-199#6#1#1 produziram diâmetros de plantas significativamente maiores do que a cv. Belíssima (5% de probabilidade) (Tabela 1). No entanto, esses diâmetros de plantas foram menores que os encontrados em outros estudos para cultivares de folhas verdes (Silva *et al.*, 2000; Diamante *et al.*, 2013; Santi *et al.*, 2013). Esse desempenho inferior pode ser explicado pelo fato de as cultivares de folhas verdes terem desempenho agrônômico superior (Becker *et al.* 2015).

Alguns relatos mostram que a coloração roxa está associada a níveis mais altos de antocianina, que conferem menor taxa fotossintética, resultando em plantas menores (Sala e Costa, 2016; Zhang *et al.* 2016).

As linhagens UFU-7#1#1#1, UFU-190#1#2#1 e UFU-199#5#1#1 apresentaram maior tolerância ao pendoamento precoce e superiores a cultivar comercial Belíssima (13,6; 18,6 e 21,3 dias, respectivamente) (Tabela 1). Temperaturas superiores às ideais para o cultivo de alface podem proporcionar pendoamento precoce que seria o alongamento do caule e produção de látex deixando as folhas amargas, rígidas e antecipa o ciclo reprodutivo (Luz *et al.*, 2009; Aquino *et al.*, 2014), resultando em redução de qualidade do produto e prejuízos financeiros.

UFU-199#6#2#1, UFU-75#2#2#1, UFU-199#2#1#1, UFU-206#1#3#1 e UFU-199#1#1#1 apresentaram maior índice SPAD/carotenoide (138,1%, 142,6%, 143,8%, 135,2% e 154,0%, respectivamente), do que a cultivar comercial Belíssima (Tabela 1). Diversos estudos mostram a eficiência do índice SPAD como alternativa, medida instantânea dos níveis de clorofila nas folhas das plantas (Klooster *et al.*, 2012). O teor de clorofila é altamente correlacionado com a concentração de carotenoides em alface (Cassetari *et al.*, 2015) e, portanto, o SPAD pode ser usado para avaliar indiretamente o teor de carotenoides nessa espécie (Cassetari *et al.*, 2015). Mesmo com a rapidez para medição em uma planta, o tempo necessário para medir um experimento com muitas plantas ainda é longo, o que dificulta as avaliações e aumenta os custos da pesquisa.

A medição do teor de carotenoides pelo SPAD durou cerca de 32 horas. Já a duração do voo, o processamento e a medição da imagem foram cinco horas. Esse tempo foi seis vezes menor quando comparado à técnica do SPAD. Além disso, a medição usando SPAD/carotenoide foi realizada em quatro plantas, enquanto a ARP possibilitou quantificar o teor de carotenoides nas dezesseis plantas da parcela experimental, sendo, portanto, quatro vezes mais eficiente. O valor da determinação dos níveis de carotenoides usando uma metodologia tradicional é de \$ 1000 por amostra (Kimura e Rodriguez-Amaya, 2002).

Diante do alto custo por amostra e da busca por maior agilidade, Cassetari *et al.* 2015 observaram alta correlação entre a quantidade de carotenoides e o índice SPAD. No entanto, este método é demorado e dispendioso devido à demanda de mão-de-obra necessária

para sua execução. Além disso, a irradiação solar influencia o resultado do índice SPAD (Hoel e Solhaug, 1998). Dessa forma, o intervalo entre a primeira avaliação e a última pode interferir no resultado final do índice SPAD.

Neste contexto, a fenotipagem por imagem pode ser uma excelente alternativa para determinar a quantidade de carotenoides, visando obter resultados de forma rápida e com custo extremamente baixo. A imagem aérea permite fotografar a parcela por inteira, e as informações de todas as plantas foram coletadas juntas. Entre outras aplicações, a ARP pode ser usado para determinar a densidade de plantio (Gnädinger e Schmidhalter, 2017) e obter informações sobre o desenvolvimento da área foliar ao longo do tempo, possibilitando conhecer o uso da água e o comportamento da cultura sob déficit hídrico durante seus estágios fenológicos (Potgieter *et al.*, 2017).

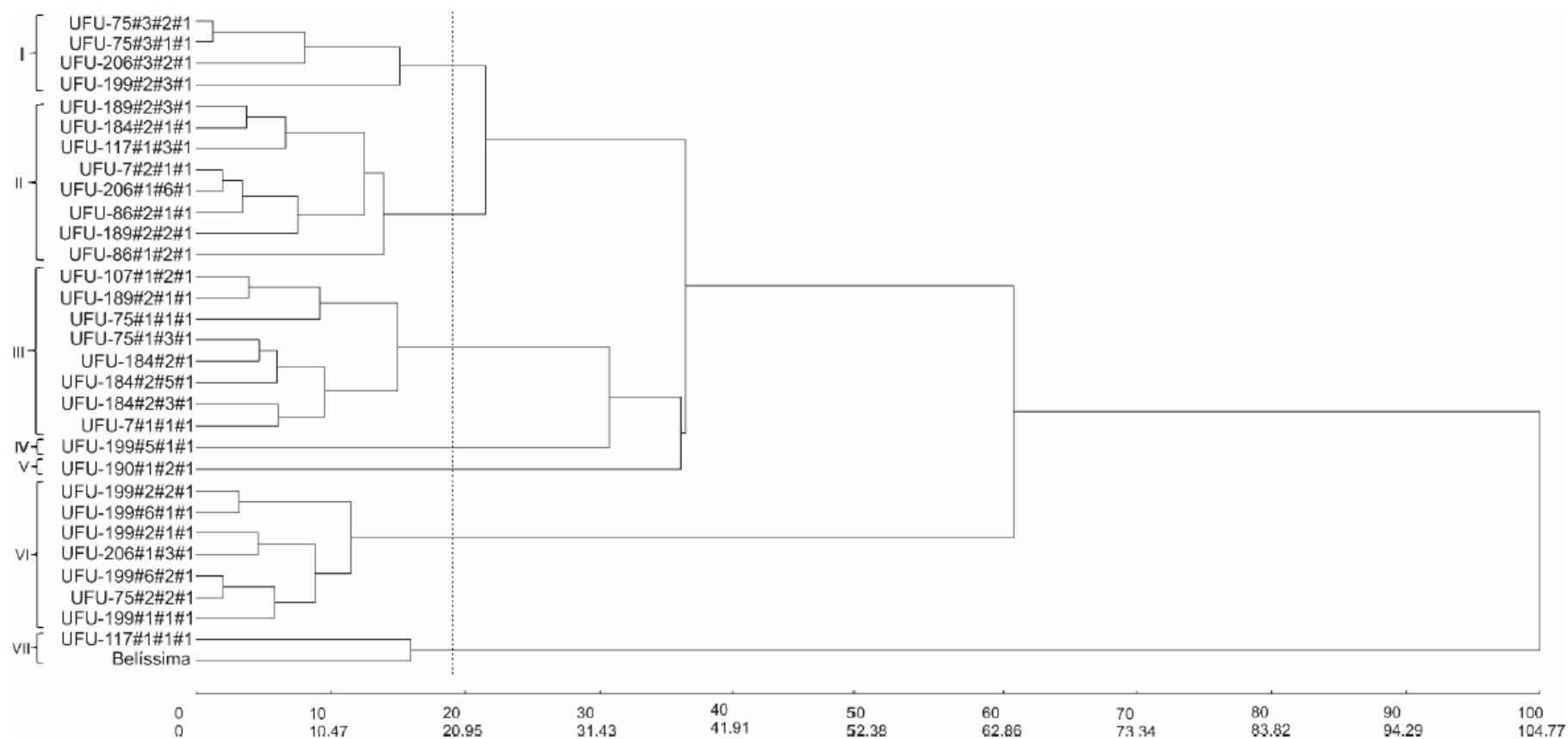
5.2 CONFIRMAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DENTRO DO BANCO DE GERMOPLASMA

Além de comparar o desempenho agrônomo (Tabela 1), os genótipos também foram separados em grupos distintos, utilizando medidas de dissimilaridade, o que pode ser útil para melhoristas de alface (Araujo *et al.*, 2016). As medidas de dissimilaridade genética (baseadas na distância generalizada de Mahalanobis, D_{ii}^2) entre os 31 tratamentos variaram de 1,2 (UFU-75#3#2#1) a 564.4 (UFU-199#1#1#1), indicando forte diversidade genética.

Os grupos formados no dendrograma UPGMA (Figura 1) apresentaram coeficiente de correlação cofenética de 0,89 (teste t, $p < 0,01$). Assim, o dendrograma refletiu satisfatoriamente os dados da matriz e os agrupamentos subsequentes. Os grupos foram separados usando uma linha de corte de 20% que foi estabelecida em pontos de mudança abrupta nos ramos do dendrograma (Cruz *et al.*, 2012). O grupo I foi composto por 4 linhagens, grupo II - 8 linhagens, grupo III - 8 linhagens, grupo IV - 1 linhagem, grupo V - 1 linhagem, grupo VI - 7 linhagens e grupo VII pela cultivar comercial Belíssima e 1 linhagem. Assim, o germoplasma avaliado no presente estudo apresenta diversidade genética e difere significativamente da cultivar comercial Belíssima (Figura 1).

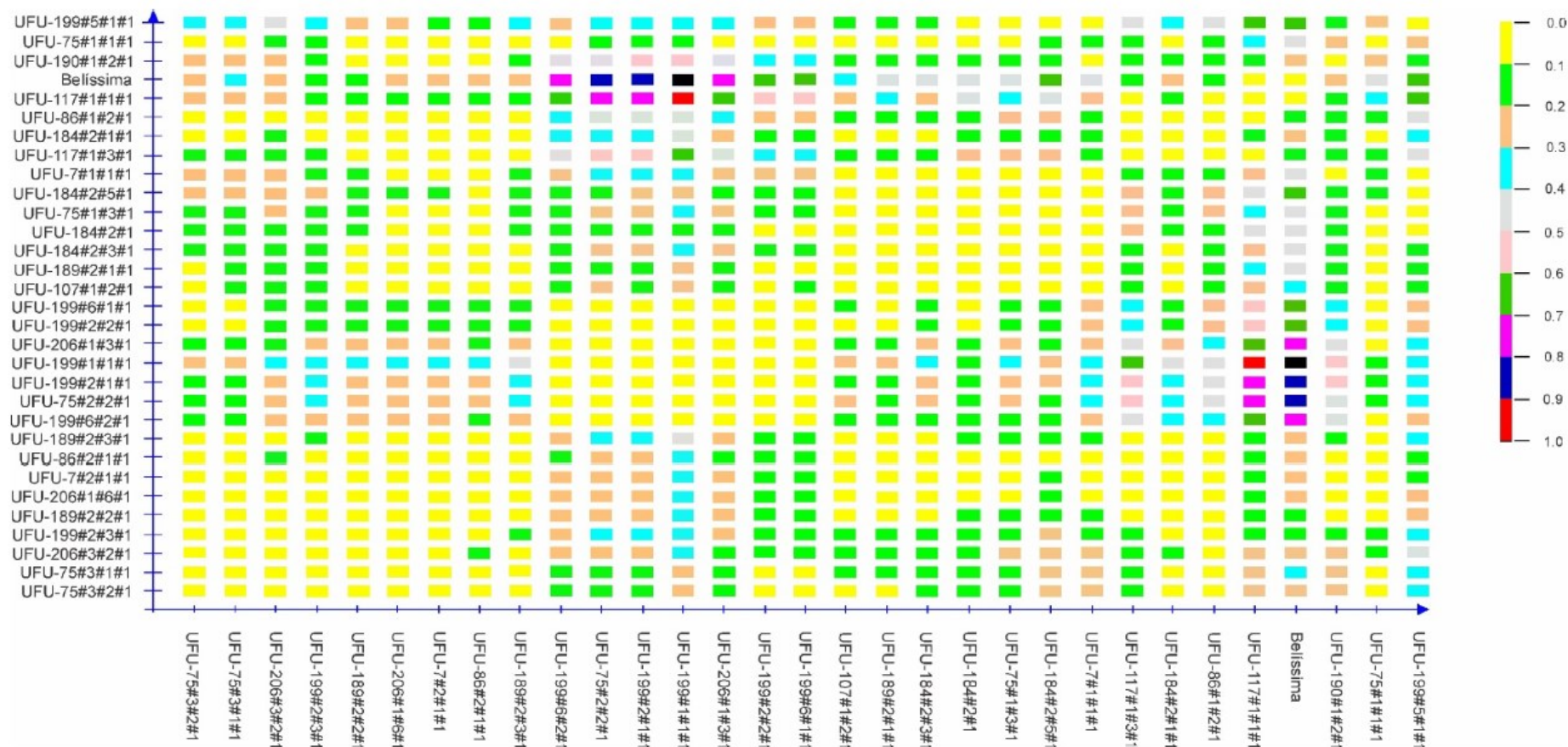
Antes de determinar a eficácia da fenotipagem da imagem, primeiro é necessário confirmar a variabilidade genética dentro do germoplasma. Assim, uma segunda metodologia foi utilizada para garantir a existência de variabilidade genética entre as 31 linhagens de alface (Figura 2). O método de otimização Torcher Gráfico pode ser usado para mostrar minúsculas dissimilaridades genéticas entre duas linhagens. Valores próximos a zero indicam maior similaridade (amarelo) enquanto valores próximos a 1 indicam maior dissimilaridade genética (preto). Os resultados da Figura 2 mostram que há uma variabilidade genética substancial entre as linhagens, o que significa que a fenotipagem da imagem pode ser usada com maior segurança.

Figura 1 Dendrograma de divergência genética entre 30 linhagens de alface e um controle comercial (cv. Belíssima) - obtido pelo método da ligação média entre grupos não ponderado (UPGMA) e medidas de dissimilaridade.



Fonte: Maciel *et al.*, 2019.

Figura 2 Agrupamento por otimização de Tocher Gráfico, baseado em sete características agrônômicas de 31 linhagens de alface roxa.



Fonte: Maciel *et al.*, 2019.

O índice SPAD/carotenoide (Cassetari et al. 2015) contribuiu mais do que qualquer outra variável para a divergência entre os genótipos (60,31% da variabilidade total) (Tabela 2).

Tabela 2. Contribuição relativa de sete caracteres agronômicos na divergência genética de 31 linhagens de alface de coloração roxa, segundo critério de Singh (1981).

Características ¹	S.j	S.j (%)
MF	243.55	1.07
DC	352.71	1.55
NF	2644.53	11.64
DP	1978.69	8.71
TF	208.81	0.92
SPAD/carotenoide	13697.70	60.31
DPS	3585.96	15.79

¹MF: massa fresca (g); DC: diâmetro do caule (cm); NF: número de folhas; DP: diâmetro de planta (cm); TF: temperatura foliar (°C); SPAD: índice SPAD/carotenoide; DPS: pendoamento após semeadura (dias).

Fonte: Maciel *et al.*, 2019.

5.3 VALIDAÇÃO DA FENOTIPAGEM POR IMAGENS PARA A IDENTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA USANDO ÍNDICE SPAD/CAROTENOIDE

Para validar a aplicabilidade da fenotipagem por imagem, primeiro foi necessário mostrar a existência da variabilidade genética entre os genótipos de alface. A Tabela 1 mostra a variabilidade entre as características. O índice SPAD/carotenoide é especialmente notável, variando de um mínimo de 17,6 para cv. Belíssima a um máximo de 44,7 por UFU-199#1#1#1. A variabilidade genética dentro do banco de germoplasma é confirmada pelo dendrograma UPGMA (Figura 1) e pelo método de otimização de Tocher Gráfico (Figura 2). Estes foram usados para determinar qual variável resposta mais contribuiu para a diversidade genética entre as linhagens de alface. O índice SPAD/carotenoide (Tabela 2) foi a variável que mais contribuiu e, portanto, foi correlacionada com a intensidade média do canal verde (G). Assim, foi realizado um modelo de regressão linear entre os valores médios do canal verde (G) e o índice SPAD/carotenoide. A Figura 3 mostra uma ortoimagem e identifica os vários tratamentos.

Figura 3 Ortoimagem aérea do experimento.



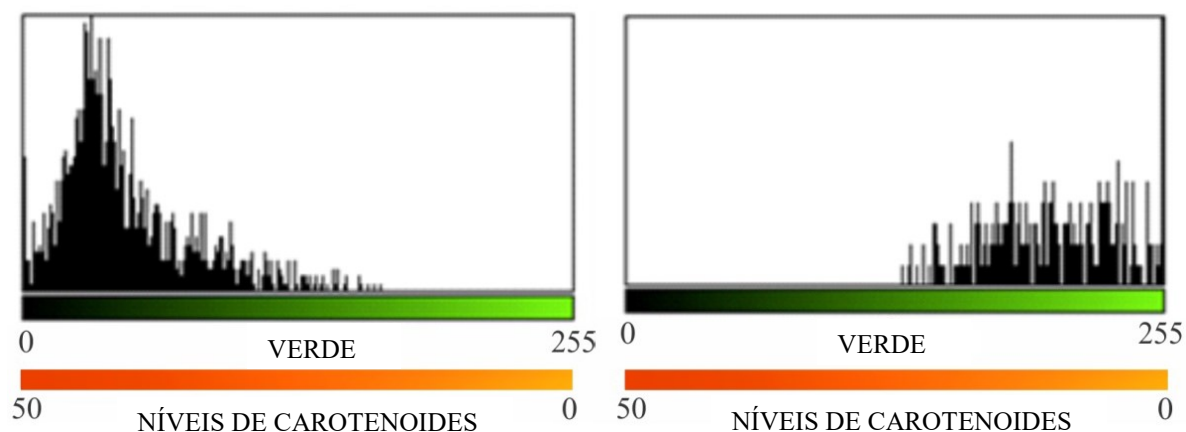
1: UFU-199#2#2#1; 2: UFU-7#2#1#1; 3: UFU-117#1#3#1; 4: UFU-86#1#2#1; 5: UFU-75#1#1#1; 6: UFU-199#6#1#1; 7: UFU-206#3#2#1; 8: UFU-199#2#3#1; 9: UFU-189#2#3#1; 10: UFU-184#2#5#1; 11: UFU-184#2#1#1; 12: UFU-107#1#2#1; 13: UFU-86#2#1#1; 14: UFU-75#3#2#1; 15: UFU-184#2#3#1; 16: UFU-199#6#2#1; 17: UFU-7#1#1#1; 18: UFU-75#2#2#1; 19: UFU-75#3#1#1; 20: UFU-190#1#2#1; 21: UFU-75#1#3#1; 22: UFU-189#2#2#1; 23: UFU-189#2#1#1; 24: UFU-199#2#1#1; 25: UFU-199#5#1#1; 26: UFU-206#1#6#1; 27: UFU-206#1#3#1; 28: UFU-117#1#1#1; 29: UFU-184#2#1; 30: UFU-199#1#1#1; 31: Belíssima.
Fonte: Maciel *et al.*, 2019.

A seguinte equação de regressão linear $G = -51,88 \times \text{SPAD} + 251,829$ foi ajustada à variável resposta média do canal verde (G) ($r = -0,8732$, coeficiente de determinação = 76,25%). O modelo mostra que, à medida que o índice SPAD/carotenoide aumenta, a resposta espectral no canal verde diminui (Figura 4).

Para a linhagem UFU-199#1#1#1 o índice SPAD/carotenoide foi de 44,7 e a intensidade média da resposta espectral no canal G foi de 47,1. As mesmas variáveis para cv.

Belíssima foram 17,6 e 198,2, respectivamente. Isso mostra que quanto maior o índice SPAD/carotenoide na planta, menor a resposta no canal verde (Figura 4).

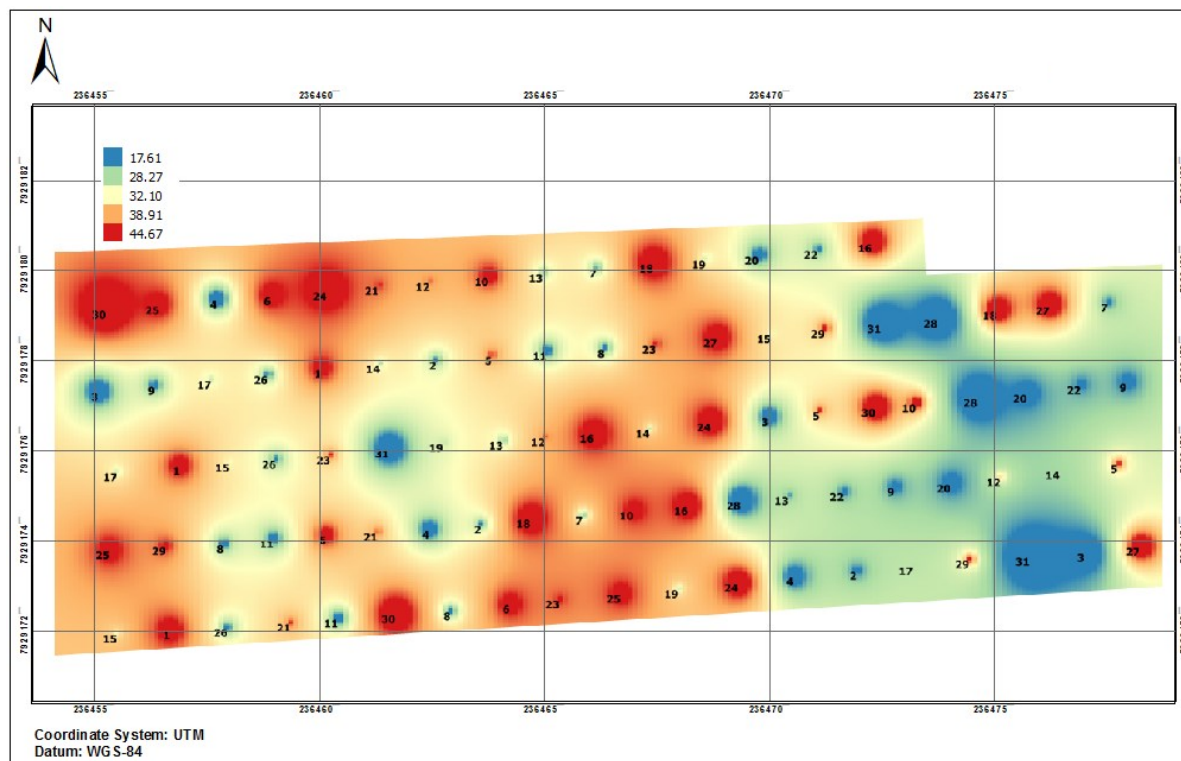
Figura 4 Histograma do índice SPAD/carotenoide para a linhagem UFU-199#1#1#1, rica em carotenoides (figura à esquerda). Histograma do índice SPAD/carotenoide para a cv. Belíssima, com níveis mais baixos de carotenoides (figura à direita).



Fonte: Maciel *et al.*, 2019.

Foi gerado um mapa de calor para interpretar visualmente as intensidades de correlação (Figura 5). As cores quentes (vermelhas) no mapa de calor estão associadas a altos valores de índice SPAD/carotenoides, enquanto as cores frias (azuis) estão associadas a valores baixos para a mesma variável.

Figura 5 Mapa de calor com valores de índice SPAD/carotenoide interpolados para cada linhagem/cultivar de alface.



1: UFU-199#2#2#1; 2: UFU-7#2#1#1; 3: UFU-117#1#3#1; 4: UFU-86#1#2#1; 5: UFU-75#1#1#1; 6: UFU-199#6#1#1; 7: UFU-206#3#2#1; 8: UFU-199#2#3#1; 9: UFU-189#2#3#1; 10: UFU-184#2#5#1; 11: UFU-184#2#1#1; 12: UFU-107#1#2#1; 13: UFU-86#2#1#1; 14: UFU-75#3#2#1; 15: UFU-184#2#3#1; 16: UFU-199#6#2#1; 17: UFU-7#1#1#1; 18: UFU-75#2#2#1; 19: UFU-75#3#1#1; 20: UFU-190#1#2#1; 21: UFU-75#1#3#1; 22: UFU-189#2#2#1; 23: UFU-189#2#1#1; 24: UFU-199#2#1#1; 25: UFU-199#5#1#1; 26: UFU-206#1#6#1; 27: UFU-206#1#3#1; 28: UFU-117#1#1#1; 29: UFU-184#2#1; 30: UFU-199#1#1#1; 31: Belíssima.

Fonte: Maciel *et al.*, 2019.

As geotecnologias são cada vez mais utilizadas em vários estudos sobre vegetais (Johann *et al.*, 2012; Rizzo *et al.*, 2012; Santi *et al.*, 2012; Victoria *et al.*, 2012; Vicente *et al.*, 2012; Picoli *et al.*, 2013; Zaman-Allah *et al.*, 2015; Vergara-Díaz *et al.*, 2016), com exceção da alface. Os resultados mostram que a fenotipagem de alto desempenho por imagem é um método eficiente para selecionar genótipos de alface com base nos níveis de

carotenoides/SPAD e pode ser uma alternativa útil para programas de melhoramento ou esforços públicos para monitorar os níveis de biofortificação em culturas usando ARPs.

6 CONCLUSÕES

O banco de germoplasma analisado possui considerável variabilidade genética.

A fenotipagem por imagem de alto desempenho foi correlacionada com a metodologia tradicional de determinação do teor de SPAD/carotenoide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCSEM. Associação Brasileira de Comércio de Sementes e Mudanças. Folhosas: Seminário Nacional. 2016. Disponível em:

http://www.abcsem.com.br/upload/arquivos/O_mercado_de_folhosas__Numeros_e_Tendencias_-_Steven.pdf. Acesso em: 31 Dez. 2018.

AMABILE, R. F.; VILELA, M. S.; PEIXOTO, J. R. **Melhoramento de plantas: variabilidade genética, ferramentas e mercado**. Embrapa Cerrados-Livro técnico (INFOTECA-E), 2018. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1106825>. Acesso em: 21 março de 2019.

AQUINO, C.R. DE; SEABRA JUNIOR, S.; CAMILI, E.C.; DIAMANTE, M.S.; PINTO, E.S.C. Produção e tolerância ao pendoamento de alface-romana em diferentes ambientes. **Rev.Ceres**. 61(4) p. 558-566, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201461040016>.

ARAÚJO, J.C.; TELHADO, S.F.P.; SAKAI, R.H.; LEDO, C.A.S.; MELO, P.C.T. Univariate and multivariate procedures for agronomic evaluation of organically grown tomato cultivars. **Horticultura Brasileira**. Vol. 34, n. 3, p. 374-380. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362016003011>.

AZEVEDO, A. M.; ANDRADE JÚNIOR, V. C. D.; OLIVEIRA, C. M. D.; FERNANDES, J. S. C.; PEDROSA, C. E.; DORNAS, M. F. S. CASTRO, B. M. D. C.; Seleção de genótipos de alface para cultivo protegido: divergência genética e importância de caracteres. **Horticultura Brasileira**, vol. 31, p. 260-265, 2013.

BARBIERI, R. L. Caracterização de germoplasma-critérios para estabelecimento de descritores. **Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2013. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/988127/1/4DescritoresRosaLiaBarbieri1.pdf>. Acesso em: 20 março 2019.

BARBOSA, V. A. A., CARDOSO FILHO, F.C., SILVA, A.X.L., OLIVEIRA, D.G.S, ALBUQUERQUE, W.F.A., BARROS, V.C. Comparação da contaminação de alface (*Lactuca Sativa*) proveniente de dois tipos de cultivo. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Ceará, v. 10, n. 2, p. 231-242, 2016.

BECKER, C.; URLIĆ, B.; ŠPIKA, M.J.; KLÄRING, H.-P.; KRUMBEIN, A.; BALDERMANN, S.; BAN, S.G.; PERICA, S.; SCHWARZ, D. Nitrogen limited red and green leaf lettuce accumulate flavonoid glycosides, caffeic acid derivatives, and sucrose while losing chlorophylls, β -carotene and xanthophylls. **Plos One**, vol. 10, n. 11, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0142867>.

BLAT, S.F.; SANCHEZ, S.V.; ARAÚJO, J.A.C.; BOLONHEZI, D. Desempenho de cultivares de alface crespa em dois ambientes de cultivo em sistema hidropônico. **Horticultura Brasileira**. vol. 29, n. 1, p. 135-138, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362011000100024>.

BRZEZINSKI, C.R.; ABATI, J.; GELLER, A.; WERNER, F.; ZUCARELI, C. Produção de cultivares de alface americana sob dois sistemas de cultivo. **Rev. Ceres**. Vol. 64, n.1, p. 83-89, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0034-737X201764010012>.

CASSETARI, L. S. **Controle genético dos teores de clorofila e carotenoides em folhas de alface**. Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

CASSETARI, L.S.; GOMES, M.S.; SANTOS, D.C.; SANTIAGO, W.D.; ANDRADE, J.; GUIMARÃES, A.C.; SOUZA, J.A.; CARDOSO, M.G.; MALUF, W.R.; GOMES, L.A. β -Carotene and chlorophyll levels in cultivars and breeding lines of lettuce.

Acta Hortic. Vol.1083, p. 469-474, 2015. DOI:

<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.60>.

COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira** 2005 v. 23 (Artigo de capa).

CRUZ, C.D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum - Agronomy** Vol. 35, n. 3, p. 271-276, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV. 514p. 2012.

DHONDT, S.; WUYTS, N.; INZÉ, D. Cell to whole-plant phenotyping: the best is yet to come. **Trends in Plant Science**, vol. 18, s.n. p. 428-439, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.008>.

DIAMANTE, M.S.; SEABRA JÚNIOR, S.; INAGAKI, A.M.; SILVA, M.B. DA; DALLACORT, R. Production and resistance to bolting of loose-leaf lettuce grown in diferente environments. **Revista Ciência Agronômica**, Vol. 44, n. 1, p.133-140, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902013000100017>.

DURÃES, F. O.; GAMA, E.; dos SANTOS, M. X.; dos SANTOS, F. G.; COELHO, A. M.; ALBUQUERQUE, P. E. P.; e de OLIVEIRA, A. C. Fenotipagem visando o melhoramento genético de milho, sorgo e milheto na Embrapa. In: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: REUNIAO TECNICA ANUAL DO MILHO, 49.; REUNIAO TECNICA ANUAL DO SORGO, 32. 2004, Porto Alegre. Anais[...] Porto Alegre: FEPAGRO/EMATER/RS, 2004. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/482175/1/Fenotipagemtolerancia.pdf>. Acesso em: 25 março 2019.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. rev. ampl. Viçosa: UFV. 421p. 2013.

GEBREMEDHIN, A.; BADENHORST, P. E.; WANG, J.; et al. Prospects for Measurement of Dry Matter Yield in Forage Breeding Programs Using Sensor Technologies. **Agronomy**. v. 9, s.n. p. 1-19, 2019.

GNÄDINGER, F.; SCHMIDHALTER, U. Digital counts of maize plants by unmanned aerial vehicles (UAVs). **Remote sensing**. Vol. 9, n. 6, p. 1-15, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/rs9060544>.

GUIMARÃES, P. H. R. **Método para fenotipagem de raiz e mapeamento associativo para tolerância à deficiência hídrica em arroz**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Genética & Melhoramentos de Plantas. Goiânia, 2017.

HOEL, B.O.; SOLHAUG, K.A. Effect of irradiance on chlorophyll estimation with the minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Annals of Botany**. vol. 82, n. 3, p. 389-392, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0683>.

JOHANN, J.A.; ROCHA, J.V.; DUFT, D.G.; LAMPARELLI, R.A.C. Estimation of summer crop areas in the state of Paraná, Brazil, using multitemporal EVI/Modis images. *Pesqui. Agropecu. Bras.* Vol. 47, n. 9, p. 1270-1278, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000900015>.

KIM, M.; MOON, Y.; TOU, J.; MOU, B.; WATERLAND, N. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 49, p. 19-34. 2016.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.A. Scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chemistry**. Vol. 78, n.3, p.389-398, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00203-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00203-0).

KLOOSTER, W.S.; CREGG, B.M.; FERNANDEZ, R.T.; NZOKOU, P. 2012. Growth and physiology of deciduous shade trees in response to controlled release fertilizer. **Sci. Hortic.** 135:71-79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.12.009>.

KŘÍSTKOVÁ, E.; DOLEŽALOVÁ, I.; LEBEDA, A.; VINTER, V.; NOVOTNÁ, A. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. **Horticultural Science**, v. 35, n. 3, p. 113-129, 2008.

LUZ, A.O. da; SEABRA JÚNIOR, S.; SOUZA, S.B.S. de; NASCIMENTO, A.S. Resistência ao pendoamento de genótipos de alface em ambientes de cultivo. **Agrarian**. Vol. 2, n. 6, p. 71-82, 2009.

MACIEL, G. M.; DE ARAÚJO GALLIS, R. B.; BARBOSA, R. L.; PEREIRA, L. M.; SIQUIEROLI, A. C. S.; PEIXOTO, J. V. M. Image phenotyping of inbred red lettuce lines with genetic diversity regarding carotenoid levels. **International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation**, v. 81, p. 154-160, 2019.

MAIANI, G.; CASTÓN, M.J.P.; CATASTA, G.; TOTI, E.; CAMBRODÓN, I.G.; BYSTED, A.; GRANADO-LORENCIO, F.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; KNUTHSEN, P.; VALOTI, M.; BÖHM, V.; MAYER-MIEBACH, E.; BEHSNILIAN, D.; CHLEMMER, U. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Mol Nutr Food Res**. Vol.53, p.194-218, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800053>.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Res**. Vol.27, n.2, p. 209-220, 1967.

Melhoramento de hortaliças. 1 ed. Viçosa: UFV, p. 95-127, 2016.

MORAES, V. S. de L.; SANTOS, M.; CARROMEU, C. Mapeamento sistemático de estudos sobre fenotipagem com a utilização de drones. In: **Embrapa Gado de Corte-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA GADO DE CORTE, 14., 2018, Campo Grande-MS.[Resumos dos trabalhos]. Brasília, DF, Embrapa, 115 p., 2018. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1099631>. Acesso em: 29 maio 2019.

PICOLI, M.C.A.; LAMPARELLI, R.A.C.; SANO, E.; MELLO, J.R.B. DE; ROCHA, J.V. Effect of sugarcaneplanting row directions on ALOS/PALSAR satellite images. **Glsci Remote Sens**. Vol.50, n.3, p.349-357, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1080/15481603.2013.808457>.

POTGIETER, A.B.; GEORGE-JAEGGLI, B.; CHAPMAN, S.C.; LAWS, K.; CADAVID, L.A.S.; WIXTED, J.; WATSON, J.; ELDRIDGE, M.; JORDAN, D.R.; HAMMER, G.L. Multi-spectral imaging from an unmanned aerial vehicle enables the assessment of seasonal leaf área dynamics of sorghum breeding lines. **Frontiers in Plant Science**. Vol. 8, n.1532, p.1-11, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01532>.

RISSO, J.; RIZZI, R.; RUDORFF, B.F.T.; ADAMI, M.; SHIMABUKURO, Y.E.; FORMAGGIO, A.R.; EPIPHANIO, R.D.V. Índices de vegetação Modis aplicados na

discriminação de áreas de soja. **Pesqui. Agropecu. Bras.** Vol. 47, n.9, p.1317-1326, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000900017>.

ROCHA, D.S., REED, E. Pigmentos naturais em alimentos e sua importância para a saúde. **J Environ Sci and Health.** Vol.41, n.1, p.76-85, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.18224/est.v41i1.3366>.

RYDER, E. J. Lettuce, endive and chicory. Boca Raton: CAB, 208 p, 1999.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. da C. **Melhoramento de alface.** In: Nick, C.; Borém, A. Melhoramento de hortaliças. 1 ed. Viçosa: UFV, p. 95-127, 2016.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. da. Retrospectiva e tendência da alfaceicultura brasileira. **Horticultura Brasileira.** Vol. 30, n.2, p.187-194, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362012000200002>.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. DA; TEIXEIRA, L. DE D.; FABRI, E.G.; BLAT, S.F. Reação de cultivares de alface a *Thielaviopsis basicola*. **Horticultura Brasileira.** Vol.26, n.3, p.398-400, 2008.

SALOMÃO, A. N. **Manual de curadores de germoplasma - vegetal: glossário.** (Documentos/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 326). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 14 p.

SANTI, A.; SCARAMUZZA, W.L.M.P.; NEUHAUS, A.; DALLACORT, R.; KRAUSE, W.; TIEPPO, R. C. Desempenho agrônômico de alface americana fertilizada com torta de filtro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira.** Vol. 31, n.2, p. 338-343, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362013000200027>.

SANTI, A.L.; AMADO, T.J.C.; CHERUBIN, M.R.; MARTIN, T.N.; PIRES, J.L.; FLORA, L.P.D.; BASSO, C.J. Análise de componentes principais de atributos químicos e físicos do solo limitantes à produtividade de grãos. **Pesqui. Agropecu. Bras.** Vol.47, n.9, p.1346-1357, 2012.

SANTOS, C.L. DO; SEABRA JUNIOR, S.; LALLA, J.G. DE; THEODORO, V.C. DE A.; NESPOLI, A. Desempenho de cultivares de alface tipo crespa sob altas temperaturas em Cáceres-MT. **Agrarian.** Vol.2, n.3, p.87-98, 2009.

SHARMA, S.; KUMAR, P.; GAMBHIR, G.; KUMAR, R.; SRIVASTAVA, D. K. Assessment of genetic diversity in lettuce (*Lactuca sativa* L.) germplasm using RAPD markers. **3 Biotech**, v. 8, n. 9, 2018.

SILVA, D. J. H., MOURA, M. C. C. L.; CASALI, V. W. D. Recursos genéticos do banco de germoplasma de hortaliças da UFV: histórico e expedições de coleta. **Horticultura Brasileira**, vol. 19, n. 2, p. 108-114, 2001.

SILVA, E. A. da. **Genética da Distribuição Quantitativa de Antocianina em Plantas de População Segregante de Alface**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, 2017.

SILVA, S.; MURA, J. **Tratado de Alimentação, Nutrição e Dietoterapia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1256p., 2010.

SILVA, V.F. DA; BEZERRA NETO, F.; NEGREIROS, M.Z. DE; PEDROSA, J.F. Comportamento de cultivares de alface em diferentes espaçamentos sob temperatura e luminosidade elevadas. **Horticultura Brasileira**. Vol.18, n.3, p.183-187, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362000000300008>.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian J Genet Plant Breed**. Vol.41, n.2, p.237-245, 1981.

SISMET. Sistema de monitoramento meteorológico - Cooxupé (Monte Carmelo). 2018. Disponível em: <http://sismet.cooxupe.com.br:9000/dados/estacao/pesquisarDados/>. Acesso em: 14 Set. 2018.

SOUSA, C. A. F. de. Fenotipagem de plantas: uma nova abordagem para um velho problema. **Embrapa Agroenergia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2014. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/991030/1/cot06.pdf>. Acesso em: 20 março 2019.

SOUSA, C. A. F.; DIAS, B. B. A.; MARTINS, P. K.; MOLINARI, H. B. C.; KOBAYASHI, A. K.; SOUZA JÚNIOR, M. T. Nova abordagem para a fenotipagem de plantas: conceitos, ferramentas e perspectivas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 08, p. 660-672, 2015.

SOUSA, C.S. DE; BONETTI, A.M.; GOULART FILHO, L.R.; MACHADO, J.R. DE A.; LONDE, L.N.; BAFFI, M.A.; RAMOS, R.G.; VIEIRA, C.U.; KERR, W.E. Divergência genética entre genótipos de alface por meio de marcadores AFLP. **Bragantia**. Vol.66, n.1, p.11-16, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052007000100002>.

SOUZA, M. C. M.; RESENDE, L. V.; MENEZES, D.; LOGES, V.; SOUTE, T. A.; SANTOS, V. F. Variabilidade genética para características agrônômicas em progênies de alface tolerantes ao calor. **Horticultura Brasileira**, v.26, p.354-358, 2008.

SUINAGA, F.A.; BOITEUX, L.S.; CABRAL, C.S.; RODRIGUES, C. da S. **Métodos de avaliação do florescimento precoce e identificação de fontes de tolerância ao calor em cultivares de alface do grupo varietal crespa**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 4p. 2013. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 89). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/956376/1/cot89.pdf>. Acesso em 20 jan. 2019

UENOJO, M.; MAROSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenoids: properties, applications and biotransformation in flavor compounds. **Química Nova**, v. 30, p. 616-622, 2007.

VERGARA-DÍAZ, O.; ZAMAN-ALLAH, M.A.; MASUKA, B.; HORNERO, A.; ZARCO-TEJADA, P.; PRASANNA, B.M.; CAIRNS, J.E.; ARAUS, J.L. A Novel Remote Sensing Approach for Prediction of Maize Yield under Different Conditions of Nitrogen Fertilization. **Front Plant Sci**. Vol.7, n.666, p.1-13, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00666>.

VICENTE, L.E.; GOMES, D.; VICTORIA, D. DE C.; GARÇON, E.A.M.; BOLFE, É.L.; ANDRADE, R.G.; SILVA, G.B.S. da. NDVI temporal series from the SPOT Vegetation sensor and SAM algorithm applied to sugarcane mapping. **Pesqui. Agropecu. Bras**. Vol.47, n.9, p.1337-1345, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000900019>.

VICTORIA, D. de C.; PAZ, A.R. da; COUTINHO, A.C.; KASTENS, J.; BROWN, J.C. Cropland area estimates using Modis NDVI time series in the state of Mato Grosso, Brazil. **Pesqui. Agropecu. Bras**. Vol.47, n.9, p.1270-1278, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000900012>.

WALTER, A.; LIEBISCH, F.; HUND, A. Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis. **Plant Methods**. vol.11, p.14, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0056-8>.

ZAMAN-ALLAH, M.; VERGARA, O.; ARAUS, J.L.; TAREKEGNE, A.; MAGOROKOSHO, C.; ZARCO-TEJADA, P.J.; HORNERO, A.; ALBÀ, A.H.; DAS, B.; CRAUFURD, P.; OLSEN, M.; PRASANNA, B.M.; CAIRNS, J. Unmanned aerial platform-based multi-spectral imaging for field phenotyping of maize. **Plant Methods**. vol.11, n.35, p.1-10, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0078-2>.

ZHANG, Y.Z.; XU, S.Z.; CHENG, Y.W.; YA, H.Y.; HAN, J. M. Transcriptome analysis and anthocyanin-related genes in red leaf lettuce. **Genet Mol Res**. Vol.15, n.1, p.1-11, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr.15017023>.

ZIECH, A.R.D.; CONCEIÇÃO, P.C.; LUCHESE, A.V.; PAULUS, D.; ZIECH, M. F. Cultivo de alface e m diferentes manejos de cobertura do solo e fontes de adubação. **Rev. bras.eng. agric. ambient**. Vol.18, n.9, p.948–954, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n09p948-954>.